Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

BIOSYNTHESE VON CHONDROITINSULFATSEITENKETTEN IM KÄLBERRIPPENKNORPEL IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

RAINER STEPHAN
aus Leipzig

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0074

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

BIOSYNTHESE VON CHONDROITINSULFATSEITENKETTEN IM KÄLBERRIPPENKNORPEL IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

RAINER STEPHAN

aus Leipzig

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Diese Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der
Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kl 193/9/1o)
ermöglicht.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 15. 12. 1978

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. Neurath

Referent: Prof. Dr. T.O. Kleine

Correferent: Prof. Dr. Schachtschabel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Abkürzungen

ChS	:	Chondroitinsulfat
CPC	:	Cetylpyridiniumchlorid
D.O.N.	:	6-Diazo-5-oxo-Norleucin
FG	:	Feuchtgewicht
M.G.	:	Molekulargewicht
RNS	:	Ribonucleinsäure
TCE	:	Trichloressigsäure
CSP	:	Chondroitinsulfatprotein
HexN	:	Hexosamin

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	2
3.	Ergebnisse	11
3.1.	Zusammensetzung und Fraktionierung der Chondroitinsulfat-(ChS-)Peptidfraktion aus Kälberrippenknorpel	11
3.2.	Doppelmarkierung der ChS-Peptidfraktion mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin während zunehmender Inkubationszeiten	11
3.3.	Doppelmarkierung der ChS-Seitenketten mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin während zunehmender Inkubationszeiten	15
3.4.	Die Wirkung von spezifischen Inhibitoren der Chondroitinsulfatprotein-Biosynthese auf die Markierung von ChS-Seitenketten	15
3.5.	Recovery-Effekt nach Entfernung der Inhibitoren	17
3.6.	Der Effekt von spezifischen Inhibitoren auf die anaerobe Glycolyse von Knorpelschnitten in vitro	24
4.	Diskussion	24
5.	Zusammenfassung	32
6.	Literaturverzeichnis	34

BIOSYNTHESE VON CHONDROITINSULFATSEITENKETTEN IM KÄLBER-RIPPENKNORPEL IN VITRO

1. Einleitung

Proteoglycane bestehen aus einem zentralen Proteincore, an das Chondroitinsulfatseitenketten über eine Bindungsregion an die Serinreste der Peptidkette kovalent gebunden sind (6,15). Die Chondroitinsulfatseitenketten bauen sich auf aus mehreren Disaccharideinheiten bestehend aus Glucuronsäure und N-Acetylgalactosamin, das am C_4- oder C_6-Kohlenstoffatom sulfatverestert ist (7). Kälberrippenknorpel eignet sich hervorragend zum Studium der Biosynthese dieses Makromoleküles, da sein Sulfopolysaccharidanteil zu mehr als 9o% aus Chondrointinsulfat besteht (8) und Knorpelschnitte unter in-vitro-Bedingungen eine hohe Einbaurate radioaktiver Vorstufen der Proteoglycansynthese aufweisen (11). In dieser Arbeit sollen zuerst Chondroitinsulfatseitenketten aus Kälberrippenknorpel isoliert und charakterisiert, sodann in vitro mit radioaktiven Vorstufen markiert werden. Ferner soll der Einfluß von "spezifischen" Inhibitoren auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatseitenketten untersucht werden, um einen Einblick in deren Regulation zu bekommen.

Diese Arbeit ist Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Forschungsprojektes, welches das Ziel hat, über die Klärung der Regulation der Biosynthese von Proteoglycanen Einblicke in die Pathobiochemie von Bindegewebskrankheiten zu bekommen.

2. METHODIK

2.1. MATERIAL

Untersucht wurde hyaliner Rippenknorpel von 3 bis 5 Monate alten Kälbern, die ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn getötet worden waren. Die Rippen wurden auf Eis aufbewahrt und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn freipräpariert.

2.1.1. HERSTELLUNG DER KNORPELSCHNITTE

Die Kälberrippen wurden bei $4^{o}C$ vom Perichondrium befreit. Unverkalkte Rippen wurden mittels Mikrotom in 5o bis 1oo μ dicke Scheiben geschnitten, diese bei $4^{o}C$ in Petrischalen auf mediumgetränktem Filterpapier aufbewahrt.
(Mikrotom der Fa. Jung, Heidelberg).

2.2. INKUBATIONSVERSUCHE IN DER WARBURG-APPARATUR

Die Knorpelschnitte wurde in Medium mit verschieden radioaktiv markierten Vorstufen sowie Hemmern der CSP-Biosynthese bei $37^{o}C$ unterschiedlich lange inkubiert.

2.2.1. ZUSAMMENSETZUNG DES MEDIUMS

Das Medium wurde aus drei Grundlösungen frisch angesetzt:
1oo ml Grundlösung 1,
5o ml Grundlösung 2,
5o ml Grundlösung 3 (1,25 ml bei Inkubation mit [^{3}H]Glucosamin) mit H_2O bidest ad 5oo ml aufgefüllt.

Grundlösung 1: 57,o4 g NaCl p.A.; 1,6o g KH_2PO_4 p.A.; 3,5o g KCl p.A.; 2,2o g $MgCl_2$ x 6 H_2O p.A.; 5o,oo ml o,1N H_2SO_4 p.A.; in 1ooo ml Aqua bidest gelöst und mit 2N NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

Grundlösung 2: 8,4o g $NaHCO_3$ p.A. in 25o ml Aqua bidest gelöst.
Grundlösung 3: 11,5o g Glucose x H_2O in 25o ml Aqua bidest gelöst.

2.2.2. RADIOAKTIVE BAUSTEINE DER CSP-SYNTHESE

Pro Ansatz (1,5 g Knorpelschnitte) wurde folgende Menge Radioaktivität eingesetzt:
3oo µCi $Na_2{}^{35}SO_4$ trägerfrei (bezogen von Fa. Buchler, Braunschweig). 3o bzw. 5o µCi D-[6-^{3}H]Glucosamin (spez. Radioaktivität 3,6 Ci/ mmol; 25 µCi L-[U-^{14}C]Serin (spez. Radioaktivität 128 mCi/mmol) (beides bezogen von Fa. NEN, Dreieichenhain). Eine entsprechende Menge wurde den Originalgefäßen entnommen und mit Medium auf o,2 ml pro Ansatz aufgefüllt.

2.2.3. VERSUCHSABLAUF

Pro Versuch wurde ein kolbenförmiges Warburggefäß im Eisbad mit 19,8o ml Medium ± Inhibitor und 1,5 g Knorpelscheiben sowie mit o,2oo ml radioaktivem Medium im Seitenarm beschickt. Diese Kolben wurden in der Warburg-Apparatur (Modell V85 der Fa.Braun, Melsungen, Schüttelfrequenz = 75 min^{-1}) mit angeschlossenen Manometern zunächst 2o min vorinkubiert unter Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxyd-Gemisch ($N:CO_2$ = 95:5), dann für folgende Versuchszeiten unter Standardbedingungen inkubiert:

A. Doppelmarkierung mit 3oo µCi $^{35}SO_4^{2-}$ plus 3o µCi [^{3}H]Glucosamin für 1o, 3o, 6o und 9o min;
B. Doppelmarkierung mit 3oo µCi $^{35}SO_4^{2-}$ plus 5o µCi [^{3}H]Glucosamin bzw. mit [^{14}C]Serin plus [^{3}H]Glucosamin für 9o min mit Inhibitoren: o,5 µM/1 Puromycin (National Chemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA), o,2 mM/1 6-Diazon-5-Oxo-L-Norleucin (D.O.N.) (National Cancer Institute Bethesda, USA), 5 µM/1 Selenat (Roth, Karlsruhe) oder o,5 mM/1 Phenylbutazon (CIBA-Geigy, Basel, Schweiz).
C. Einfachmarkierung nach Inhibitoreneinwirkung (o,5 µM/1 Puromycin, o,4 mM/1 D.O.N., 5 µM/1 Selenat oder o,5 mM/1 Phenylbutazon) mit $^{35}SO_4^{2-}$ [^{3}H]Glucosamin (5o µCi) oder [^{14}C]Serin.

Zum Zeitpunkt t = O wurden die Radioaktivitäten durch Kippung der Gefäße mit dem Medium vereinigt, das System zum Druckausgleich 3o Sekunden belüftet, dann die Hähne geschlossen und die Manometer fortlaufend abgelesen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Gefäße in Eis gebracht und die Reaktion durch Zugabe von 1o,o ml eiskaltem Medium gestoppt.

Bei Versuch C wurde 8omin mit je einem Inhibitor vorinkubiert, danach sofort bei $4^{o}C$ weiterbehandelt: Das Medium wurde gesammelt, die Knorpel im Warburggefäß 4 mal mit 2o,o ml eiskaltem inaktiven Medium gewaschen, zwischen Filterpapier abgetupft, erneut mit zweimal 2o,o ml obigem Medium gewaschen und mit 2o,o ml Medium mit einem radioaktiven Precursor in ein frisches Warburggefäß gebracht. Dieses wurde für 6o min (unter Begasung in den ersten 2o min) weiter inkubiert wie oben, danach die Reaktion im Eisbad mit 1o,o ml eiskaltem Medium gestoppt.

2.2.4. MANOMETRISCHE KONTROLLE DER ANAEROBEN GLYCOLYSE (Umbreit et.al., 1964)

Pro Versuch wurden zwei Thermo-Barometer mit je 2o,o ml Medium ohne Knorpelschnitte mitgefahren, um einen Korrekturwert für Änderungen der Außenbedingungen zu erhalten.
Aus den abgelesenen Manometerwerten wurde die pro Versuch entwickelte Menge CO_2 errechnet nach der Formel

$$X_{\mu l} = K.h_{mm}$$

Dabei bedeuten:
$X_{\mu l}$ = gebildete CO_2-Menge in µl (auf 76o mm Hg und $O^{o}C$ bezogen).
K = Gefäßkonstante (alle während des Versuchs konstanten Faktoren, s.u.).
h_{mm} = Manometrische Differenz (in mm, korrigiert durch die Werte der Thermo-Barometer).

Die Gefäßkonstante wurde für jeden Versuch berechnet nach der Formel

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_o}$$

Dabei bedeuten:

V_g : Gesamtes Volumen des Reaktionsgefäßes inclusive Manometer bis zum Flüssigkeitspegel bei Ausgangsstellung (15o mm), abzüglich V_f.

V_f : Volumen der eingebrachten Probenmenge (hier 2o,o ml).

T : Absolute Temperatur (hier 31o°K = 37°C).

α : Bunsen'scher Absorptionskoeffizient für CO_2 bei 37°C (hier o,567).

P_o : Normaldruck = 1o ooo mm Säule einer Brodie'schen Lösung (die hier als Sperrflüssigkeit verwendet wurde).

Der Wert $X_{\mu l}$ wurde dann für jeden Versuch mit der Gasvolumenkonstante (1Mol Gas unter Normalbedingungen = 22,4 l) in µMol umgerechnet und auf eine Stunde und 1 g Knorpelfeuchtgewicht angegeben.

2.3. AUFARBEITUNG DER INKUBIERTEN KNORPELSCHNITTE

2.3.1. ISOLIERUNG DER CHONDROITINSULFAT-(ChS-)PEPTIDE AUS KNORPELSCHNITTEN

Die Schnitte wurden in geschlossenen Gefäßen in EDTA-Na-Azetat-Puffer (o,1 M/l Natriumazetat, 5 mM/l EDTA, pH 6,25) mit Papain (o,2 - o,3 U/mg an CM-Cellulose gebunden, Merck) 48 Stunden im 6o°C-Wasserbad geschüttelt (Schüttelfrequenz = 1oo min^{-1}).
Nach Abkühlung auf 4 °C wurde TCE zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 5% TCE entstand; nach einer Stunde Reaktionszeit in Eis wurde 2o min bei 6ooo RpM zentrifugiert, die Überstände gesammelt. Der papainunverdauliche Rückstand wurde zweimal mit 1 ml TCE 5% (eiskalt) gewaschen, die gesammelten Überstände mit kristallinem $NaHCO_3$ p.A. neutralisiert (pH 5,8) und zur Entfernung der freien Radioaktivität dialysiert (Schläuche Fa. Union Carbide, Porengröße: 1o ooo - 2o ooo M.G. bzw. Fa. Spectrum medical industries, Los Angeles, Porengröße: 6ooo - 8ooo M.G.. Unterschiede in der Ausbeute konnten nicht festgestellt werden).

Dialyse erfolgte gegen Aqua bidest (mindestens je 8o l) bei 4°C acht bis vierzehn Tage.

2.3.2. REINIGUNG DER ChS-PEPTIDE MITTELS CPC-ALKOHOL-FÄLLUNG (Kleine et.al., 1968).

Die Proben wurden mit Cetylpyridinium.Chlorid (CPC) versetzt (mindestens 3oo - 4oo mg auf 1oo uMol GlcS) und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Dann wurden sie bei 1o°C und 2o ooo Rpm 6o min zentrifugiert, die klaren Überstände abgesaugt, die Niederschläge dreimal mit 3 ml Waschlösung (o,1% CPC) gewaschen, bei 2o ooo Rpm und 25°C zentrifugiert, die klaren Überstände wurden entfernt, Die Niederschläge wurden in 4 ml 2 M/l $MgCl_2$-Lösung mit 1 ml Methanol p.A. bei 37°C vollständig gelöst, mit 12,5 ml eiskaltem Äthanol p.A. gefällt und 12 Stunden im Eisbad stehengelassen, dann bei 0°C und 2o ooo Rpm zentrifugiert, klare Überstände dekantiert, zweimal bei 0°C mit 8o% Äthanol p.A. (eiskalt) gewaschen.
Die gereinigten Niederschläge wurden in 2 ml Aqua bidest aufgenommen und dann dialysiert (Schläuche der Fa. Union Carbide).

2.3.3. FRAKTIONIERUNG DER ChS-PEPTIDE AUF ECTEOLA-ZELLULOSE (Kleine et. al., 1968).

Die salzfreien Proben wurden mit HCl auf o,o5 M/l eingestellt und auf einer ECTEOLA-Zellulose-Säule (1 x 15 cm, Serva Heidelberg) mittels stufenweise ansteigenden NaCl-Lösungen (gelöst in o,o5 M/l HCl) nach ansteigender Kettenlänge und Sulfatierungsgrad in 7 Unterfraktionen aufgetrennt; nach Dialyse und Gefriertrockung erfolgte die Analyse der Proben.

2.4. BAUSTEINANALYSEN

2.4.1. BESTIMMUNG VON GLUCURONSÄURE MITTELS CARBAZOL-REAKTION (Bitter und Muir, 1962)

Reagenzien:

1: Schwefelsäure-Reagenz
o,25 M/1 $Na_2B_4O_7$ x H_2O p.A. in konz. H_2SO_4 p.A. (d = 1,84)

2: Carbazol-Reagenz
1,25 g/L Carbazol, purum (Merck) in absolutem Äthanol p.A.

3: Standardlösung
1oo mg Glucuronsäure-Lacton in 1oo ml Auqa bidest.

Ausführung:

Reagenzgläser im Eisbad mit 5 ml Schwefelsäure-Reagenz beschicken, 1 ml Probe zugeben und im Eisbad mixen; danach 1o min in ein heftig kochendes Wasserbad, nach Abkühlung im Leitungswasserbad jede Probe mit o,2 ml Carbazol-Reagenz versetzen, mixen und 15 min in kochendes Wasserbad. Ablesen in 1 cm-Küvetten im Eppendorf-Photometer bei λ = 546 mm.
Extinktionskoeffizient: $E_{\mu Mol}$ = 3,o6o.

2.4.2. BESTIMMUNG VON SULFATESTERN MITTELS BENZIDIN-REAKTION (Kleine et. al., 1968)

Reagenzien:

1: 1 g Benzidin p.A. (Merck) auf 1oo ml absol.Äthanol p.A.
2: 1 M/1 HCl p.A.
3: Natriumnitrit-Reagenz
2oo mg $NaNO_2$ p.A. auf 1oo ml Aqua bidest.
4: Thymol-Reagenz
5oo mg Thymol p.A. und 7,5 g NaOH auf 1oo ml Aqua bidest.
5: Konzentrierte HCOOH p.A.
6: Feinkörniger Glassand p.A. (Merck)
7. Schwefelsäure-Standardlösung 1N H_2SO_4.

Ausführung:

Für jede Analyse wurde eine Eichkurve aus 12 Werten und 4 Leerwerten gefahren.

Hydrolyse: 1 ml Probe und o,6 ml HCOOH im Reagenzglas mixen, zuschmelzen, 1o Stunden bei 11o°C im Wasserbad hydrolisieren, Gläser öffnen, o,4 ml H_2O bidest zusetzen, mixen.
Analyse: Hiervon 1,5 ml entnehmen, mit 3,75 ml Benzidin-Reagenz versetzen, 2 Stunden in Eis stellen, dann o,1 g Glassand zusetzen. Bei 4°C weiterarbeiten: 1o min 6ooo Rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Gläser umgekehrt auf Filterpapier stellen, nach 1o min um die Öffnung herum waschen, außen mit Azeton, innen mit Äthanol getränkten Watteträgern. Gläser im Eisbad mit 9 ml Äthanol abs. p.A. waschen, abzentrifugieren, Gläser umgekehrt auf Filterpapier stellen, für 5 min.
Bei Zimmertemperatur weiterarbeiten:
Niederschlag in 2,5 ml HCl aufnehmen, nach 5 min 1 ml $NaNO_2$-Reagenz, dann 4 ml Thymol-Reagenz zugeben, mixen, 1o min bei 6ooo Rpm zentrifugieren; vom klaren Überstand o,3 ml auf 3 ml mit Aqua bidest auffüllen, Rotfärbung im Zeiss-Photometer bei λ = 49o nm in 1 cm-Küvetten ablesen.

2.4.3. BESTIMMUNG VON AMINOZUCKERN MITTELS ELSON-MORGAN-REAKTION
(Antonopoulos et.al., 1964)

Reagenzien:

1: 1,25N Na_2CO_3 x 1o H_2O in Auqa bidest

2: Acetyl-Aceton-Reagenz
3% Acetyl-Aceton p.A. in 1,25N Na_2CO_3 x 1o H_2O (unmittelbar vor Gebrauch hergestellt).

3: EHRLICH's Reagenz
2,5 g p-Dimethylaminobenz - aldehyd p.A. in 3o ml konz. (rauchend) HCl (37%) und 3o ml Äthanol absol. p.A. im Eisbad lösen.

4: Eichlösung
1o mg Glucosamin-HCl in 1oo ml Aqua bidest.

Ausführung:
Hydrolyse: o,5 ml Probe und o,5 ml HCl (37%) verschlossen 6 Stunden bei 1oo°C im Wasserbad hydrolisieren, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einengen, 1 ml H_2O zugeben, nochmals einengen, jede Probe in o,25 ml Aqua bidest aufnehmen.
Analyse: Probe (o,25 ml) und o,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz mixen, im verschlossenen Glas 6o min im Wasserbad bei 9o°C inkubieren, im Leitungswasserbad kühlen; dazu 2 ml Äthanol abs. p.A. und o,25 ml Ehrlich's Reagenz mixen, nach genau 3o min (Reaktion ist sehr zeitabhängig) im Zeiss-Spektralphotometer in 2 cm-Küvetten bei λ = 535 nm ablesen.
Extinktionskoeffizient: $E_{\mu Mol}$ = 12,47o.

2.5. MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Die Messung der mit ^{35}S-und ^{3}H-markierten Proben wurde in Dioxan-Szintillator-Lösungen im Liquid Szintillation Counter (Fa. Packard, Frankfurt; Modell 338o) durchgeführt, der aus den gemessenen Impulsen die jeweiligen Zerfälle pro Minute errechnet und angibt. Eichung und Einstellung erfolgte gemäß den Anweisungen der Fa. Packard, Frankfurt.

Bis zu 1 ml Probe wurde in 15 ml Dioxan-Szintillator folgender Zusammensetzung eingebracht:
8,o g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) für Szintillationsmessungen (Merck),
o,6 g 2,2-p-Phenylen-bis (4-methyl-5-Phenyloxazol) (Dimethyl-PoPoP) für Szintill.Mess. (Merck),
15o g Naphthalin für Szintill.Mess. (Merck), gelöst in
1 l Dioxan für Szintill.Mess. (Merck).

2.6. STATISTISCHE BERECHNUNGEN

Aus entsprechenden Versuchsergebnissen wurden die arithmetischen Mittel mit ihren Standardabweichungen ermittelt. Verschiedene Kollektive wurden mittels des Student-t-Wertes auf signifikante Unterschiede hin getestet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe einer Diehl-Combitron-Rechenmaschine (mit Sonderprogramm)

nach Programmen der Firma Diehl durchgeführt.

1. Arithmetische Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. Standardabweichung

$$S_n = \sqrt{\frac{(\bar{x}-x_i)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i)^2 - \frac{1}{n} \cdot (x_i)^2}{n-1}}$$

3. Student-t-Wert

$$t = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{r_{\bar{x}-\bar{y}}}$$

wobei $r_{\bar{x}-\bar{y}} = S_{x+y} \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x}-x_i)^2 + \sum(\bar{y}-y_i)^2}{n_x-1 + n_y-1}} \times \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}}$

Dabei bedeuten:

n_x, n_y : Anzahl der Werte im Kollektiv

$\bar{x}$, $\bar{y}$: Arithmetische Mittel der Werte

S_x, S_y : Standardabweichungen im Kollektiv

$r_{\bar{x}-\bar{y}}$: Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel

t : Student-t-Wert.

3. Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung und Fraktionierung der Chondroitinsulfat (ChS)-Peptid-Fraktion aus Kälberrippenknorpel

Nach Reinigung des Papaindigests mittels CPC-Alkohol-Fällungen (Verlust des Verfahrens < 1o% bezogen auf Hexuronsäure des Papaindigests) enthalten 1 g Knorpelfeuchtgewicht ca. 1oo µmole Hexuronsäuren bzw. Aminozucker (Tabl.1), die zu mehr als 98% Chondroitinsulfatpeptiden zuzuordnen sind (Glucosamingehalt 1-2%, vgl. (7,13)). Diese Chondroitinsulfatpeptide erweisen sich als heterogen in Bezug auf Molekulargewicht und Sulfatierungsgrad: Nach Auftrennung auf ECTEOLA-Zellulose mittels stufenweise zunehmender Konzentrationen von NaCl werden 7 Fraktionen erhalten, die ein ganzes Spektrum unterschiedlich langer und sulfatierter ChS-Seitenketten aufweisen (Tab.1): Weniger als 1% der Gesamturonsäure entfällt auf kurze, untersulfatierte Seitenketten (errechnetes MG < 5ooo (vgl.13), Fraktionen 2,3). 2 Typen von etwas längeren Seitenketten lassen sich unterscheiden: eine etwas untersulfatierte, kürzere ChS-Kettenfraktion (Fraktion 4, MG ~ 1o ooo) und eine leicht übersulfatierte, längere ChS-Kettenfraktion (Fraktion 7, MG ~ 12 ooo). Die Hauptmasse an Seitenketten (ca. 75%) besteht aus langen, fast gleichmäßig sulfatierten Seitenketten (Fraktionen 5 und 6, MG zwischen 13 6oo - 16 2oo). ECTEOLA-Fraktion 1 enthält hauptsächlich Hyaluronsäure (vgl. 7,13) und soll deshalb hier nicht eingehend besprochen werden.

3.2. Doppelmarkierung der ChS-Peptidfraktion mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin während zunehmender Inkubationszeiten

Unter den angegebenen Bedingungen (s. 2.2.3 A) wurde die ChS-Peptidfraktion linear erst nach 35 - 45 min mit den beiden radioaktiven Vorstufen markiert (Fig.1), und zwar zeigte die Sulfatestermarkierung eine zunehmend höhere spezifische Markierung (nach der 6o.min 2-3, nach der 9o.min 3-4 mal höher

Fraktion	Hexuronsäure µmol/g FG	Hexosamine µmol/g FG	Sulfatester µ/mol SO_4^{2-}/g FG	Sulfatierungsgrad SO_4^{2-} / Hexuronsäure	Sulfatierungsgrad SO_4^{2-} / Hexosamine	Errechnetes Molekulargewicht der ChS-Ketten (vgl.13)
Papaindigest	1o9,18 ± 6,91	116,2o ± 9,61	---	---	---	---
CPC-gereinigte Ausgangsfraktion 1	1oo,6o ± 6,o6 1oo%	95,7o ±14,o3	1o2,17 ± 5,14	1,o1	1,o7	13 8oo
Fraktion 1 o,o5 M/1 HCl	1,19 ± o,21 1,3%	o,67 ± o,26	o,44 ± o,33	o,4o	o,66	---
Fraktion 2 o,1 M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	o,14 ± o,o9 o,1%	o,17 ± o,o9	o,o4 ± o,o2	o,29	o,24	2 ooo
Fraktion 3 o,25 M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	o,14 ± o,o4 o,1%	o,16 ± o,o8	o,12 ± o,11	o,86	o,75	4 9oo
Fraktion 4 o,5o M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	4,26 ± 1,15 4,2%	4,15 ± o,68	3,34 ± 1,o4	o,78	o,8o	9 8oo
Fraktion 5 o,75 M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	39,11 ± 3,39 38,7%	39,88 ± 3,32	35,o9 ± 3,35	o,9o	o,88	13 6oo
Fraktion 6 1,oo M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	35,31 ± 5,o2 35,o%	35,85 ± 2,43	35,o9 ± 5,14	o,99	o,98	16 2oo
Fraktion 7 2,oo M/1 NaCl in o,o5 M/1 HCl	4,15 ± 1,19 4,1%	4,9o ± o,79	5,14 ± o,74	1,24	1,o5	11 8oo

Tabelle 1

Zusammensetzung und Fraktionierung der Chondroitinsulfat (ChS)-Peptid-Fraktion aus Kälberrippenknorpel. Mittelwert von 4o Versuchen ± Standardabweichung. Molekulargewicht errechnet nach Kleine und Stephan (1976).

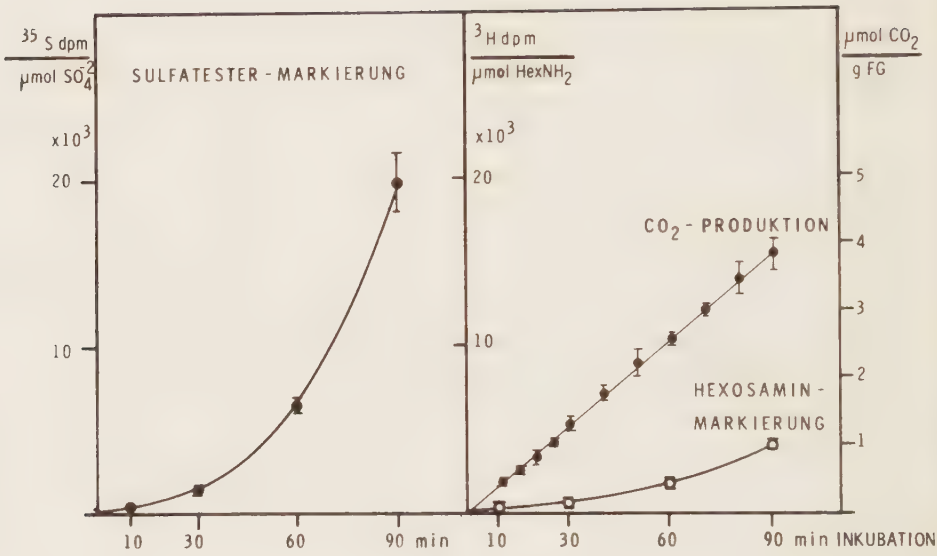

Fig. 1 Zeitabhängigkeitsmarkierungen der Chondroitinsulfat-Peptidfraktion aus Kälberrippenknorpel mit $^{35}SO_4^{2-}$- und [^{3}H]Glucosamin.

Einzelheiten s. Methodik(2.2.3. A). - CO_2-Produktion von Knorpelschnitten in vitro. Einzelheiten s. Methodik (2.2.4.)

als die Polysaccharidmarkierung). Während dieser Zeit stieg die CO_2-Bildung linear an (Fig.1).

3.3. Doppelmarkierung der ChS-Seitenketten mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin während zunehmender Inkubationszeiten

Entsprechend der unterschiedlichen Markierung der gesamten ChS-Peptidfraktionen (s. 3.2.) zeigten die ChS-Seitenkettenfraktionen niedrigere spezifische Markierungsraten mit [^{3}H]Glucosamin im Vergleich zu $^{35}SO_4^{2-}$ (Fig.2). Kleine Seitenketten (M.G.$<$5ooo) wiesen die höchsten spezifischen Markierungsraten auf nach 1o min $^{35}SO_4^{2-}$-Markierung und 3o min [^{3}H]Glucosaminmarkierung. Nach längeren Inkubationszeiten (3o, 6o und 9o min, Fig.2) wurde die längerkettige untersulfatierte Fraktion 4 (M.G.$\sim$1o ooo) am höchsten von beiden radioaktiven Precursors markiert und die spezifische Radioaktivität der Hauptmasse an Seitenketten wird größer. Ausnahmen machen die leicht übersulfatierte Fraktion 7, die im Vergleich zu kurzen Seitenketten höhere Radiosulfatmarkierungsraten nach 1o, 3o und 6o min Inkubation aufwies als die [^{3}H]Glucosaminmarkierungsraten sowie die Fraktion 1, die praktisch keine $^{35}SO_4^{2-}$-Markierung und eine niedrigere spezifische [^{3}H]Glucosaminmarkierung zeigte im Vergleich zu kürzeren ChS-Seitenketten.

3.4. Die Wirkung von spezifischen Inhibitoren der Chondroitinsulfatproteinbiosynthese auf die Markierung von ChS-Seitenketten

Der Effekt von spezifischen Inhibitoren der Chondroitinsulfatproteinbiosynthese auf die in-vitro-Markierung von ChS-Seitenketten mit $^{35}SO_4^{2-}$, [^{3}H]Glucosamin oder [^{14}C]Serin wurde nach 2o min Vorinkubation und 9o min Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren untersucht (Doppelmarkierung s. 2.2.3. B).

o,5 µM/l Puromycin hemmte den Einbau von [^{14}C]Serin in den Peptidrest von allen ChS-Seitenketten praktisch vollständig

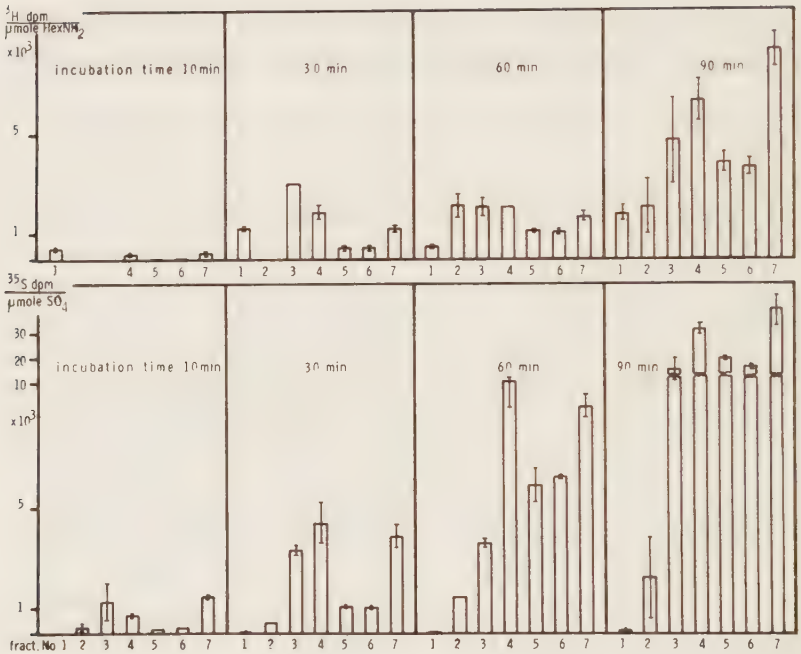

Fig. 2 Zeitabhängigkeitsmarkierungen der Chondroitinsulfatseitenketten aus Kälberrippenknorpel.
Die mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin markierte ChS-Peptidfraktion wurde mittels Chromatographie auf ECTEOLA-Zellulose in ChS-Ketten ansteigender Kettenlänge und zunehmenden Sulfatierungsgrad aufgetrennt und analysiert.
Einzelheiten s. Methodik.

mit der einzigen Ausnahme der Peptidreste von sehr kurzen ChS-Seitenketten (M.G. < 5ooo, Fraktionen 2,3, Tab.4). Dagegen war der Einbau von [^{3}H]Glucosamin und $^{35}SO_4^{2-}$ nur partiell gehemmt (Hemmraten 2o bis 5o%) bzw. unverändert oder gesteigert für die längere, leicht übersulfatierte Fraktion 7 und Fraktion 1, der Hyaluronsäurefraktion (Tab. 2,3).

o,2 mM D.O.N. hemmte den [^{14}C]Serineinbau nur in die Peptidreste längerer ChS-Ketten (Fraktionen 4-7), in kürzere war er dagegen gesteigert (Fraktionen 2,3, Tab.4). Ähnlich verhielt sich der [^{3}H]Glucosamineinbau (Tab.3), während der $^{35}SO_4^{2-}$-Einbau in den Fraktionen 3-7 leicht vermindert, in F_2 dagegen gesteigert war (Tab.2). Auf den Einbau in die ChS-Peptid-Gesamtfraktion bezogen, war der Einbau von [^{14}C]Serin am stärksten vermindert.

5 µM/l Selenat hemmte den [^{14}C]Serineinbau deutlich nur in der leicht übersulfatierten ChS-Fraktion 7 (Tab.4), während eine Hemmung der [^{3}H]Glucosaminmarkierung und der $^{35}SO_4^{2-}$-Markierung aller ChS-Seitenketten stärker und nahezu gleichmäßig auftrat (Tab. 2,3).

o,5 mM/l Phenylbutazon verminderte die [^{14}C]Serinmarkierung der Peptidreste aller längeren ChS-Seitenketten (Fraktionen 4-7, Tab.4) um ca. 5o%, nicht dagegen bei kürzeren Seitenketten. Ähnlich verhielt sich der Einbau von [^{3}H]Glucosamin und $^{35}SO_4^{2-}$, der weniger stark gehemmt war, insbesondere bei Fraktion 7 (Tab. 2,3). Auf den Einbau in die ChS-Peptid-Gesamtfraktion bezogen, war der Einbau von [^{14}C]Serin am stärksten vermindert.

3.5. Recovery-Effekt nach Entfernung der Inhibitoren

Um einen möglichen Recovery-Effekt der Chondroitinsulfatbiosynthese nach Entfernung der Inhibitoren zu untersuchen, wurden Knorpelschnitte zuerst ohne radioaktive Procursor mit dem

TABELLE: 2 $^{35}SO_4^{2-}$-Einbau
2o Min. Vorinkubation, 9o Min. Inkubation mit $^{35}SO_4^{2-}$

Fraktion	Kontrollen (n=2) dpm ^{35}S	S/µMol SO_4^{2-}	Puromycin $5 \cdot 1o^{-5}$M (n=2) dpm ^{35}S	S/µMol SO_4^{2-}	6-Diazo-5-oxonorleuc $2 \cdot 1o^{-4}$M (n=2) dpm ^{35}S	S/µMol SO_4^{2-}
Papaindigest	38o29 ± 6oo	1oo%	11513 ± 1o9 p < o,oo1	3o%	29256 ± 469 p < o,oo1	77%
CPC-gereinigte Ausgangsfraktion	19722 ± 1694	1oo%	5921 ± 495 p < o,o1	3o%	161o3 ± 766	82%
F1 o,o5 M HCl	89 ± 52	1oo%	15o ± 66	169%	192 ± 125	216%
F2 o,1 M NaCl in o,o5 HCl	2142 ± 16oo+	1oo%	78o ± 619+	36%	3o26 ± 1538+	141%
F3 o,25 M NaCl in o,o5 M HCl	15565 ± 4961+	1oo%	263o ± 62+	17%	12236 ± 35o+	79%
F4 o,5 M NaCl in o,o5 M HCl	31566o ± 1179	1oo%	6337 ± 17o4 p < o,oo5	2o%	25537 ± 8468	81%
F5 o,75 M NaCl in o,o5 M HCl	196oo ± 1192	1oo%	6261 ± 2o48 p < o,o2	32%	18794 ± 9oo7	96%
F6 1,o M NaCl in o,o5 HCl	16o63 ± 544	1oo%	6868 ± 3465	43%	13959 ± 1o11	87%
F7 2,o M NaCl in o,o5 HCl	39284 ± 8o19	1oo%	4o317 ±1691o	1o3%	34757 ± 1246	88%

+bezogen auf Uronsäure

Na-Selenat $5 \cdot 1o^{-6}$M (n=2) dpm^{35} S/µMol SO_4^{2-}	Phenylbutazon $5 \cdot 1o^{-4}$M (n=2) dpm^{35} S/µMol SO_4^{2-}	Fraktion
31995 ± 4o63 84%	23611 ± 479 p < o,oo1 62%	Papaindigest
15342 ± 762 78%	1268o ± 933 p < o,o5 64%	CPC-gereinigte Ausgangs-fraktion
541 ± 52o 6o8%	232 ± 219 261%	F1 o,o5 M HCl
2671 ± 2531+ 125%	2129 ± 11o8+ 99%	F2 o,1 M NaCl in o,o5 M HCl
11398 ± 5o66+ 73%	16538 ± 2751+ 1o6%	F3 o,25 M NaCl in o,o5 M HCl
25955 ± 1o21 p < o,o5 82%	16562 ± 12o28 52%	F4 o,5 M NaCl in o,o5 M HCl
12786 ± 486 p < o,o2 65%	987o ± 1175 p < o,o2 5o%	F5 o,75 M NaCl in o,o5 M HCl
12666 ± 199 p < o,o2 79%	9o15 ± 47o p < o,o1 56%	F6 1,o M NaCl in o,o5 M HCl
31483 ± 2157 8o%	27819 71%	F7 2,o M NaCl in o,o5 M HCl

Mittelwert mit Standardabweichung

Prüfung auf Signifikanz mittels t-Test nach Student

TABELLE: 3 ^{3}H-Glucosamin-Einbau
2o Min. Vorinkubation, 9o Min. Inkubation mit ^{3}H-Glucosamin

Fraktion	Kontrollen (n=4-8) dpm ^{3}H/µMol HexN		Puromycin $5 \cdot 1o^{-5}$M (n=2) dpm ^{3}H/µMol HexN		6-Diazo-5-oxonorleuc $2 \cdot 1o^{-4}$M (n=2) dpm ^{3}H/µMol HexN	
Papaindigest	7831 ± 673	1oo%	4o66 ± 12o p < o,oo1	52%	7oo7 ± 42	89%
CPC-gereinigte Ausgangsfraktion	3943 ± 256	1oo%	1995 ± 212 p < o,oo1	51%	35o2 ± 293	89%
Fraktion 1 o,o5 M HCl	2332 ± 64o	1oo%	5888 ± 2o57	252%	3319 ± 1334	142%
Fraktion 2 o,1 M NaCl o,o5 M HCl	1945 ± 13o4^{+}	1oo%	1857 ± 653^{+}	95%	1oo75 ± 6o5^{+} p < o,o2	518%
Fraktion 3 o,25 M NaCl in o,o5 M HCl	3275 ± 161o^{+}	1oo%	1o2o ± 33o^{+}	31%	5154 ± 2oo3^{+}	157%
Fraktion 4 o,5 M NaCl in o,o5 M HCl	6383 ± 1686	1oo%	2o62 ± 1273 p < o,o25	32%	11799 ± 3o65 p < o,o25	185%
Fraktion 5 o,75 M NaCl in o,o5 M HCl	3711 ± 459	1oo%	694 ± 18o p < o,oo1	19%	3383 ± 496	91%
Fraktion 6 1,o M NaCl in o,o5 M HCl	3543 ± 595	1oo%	188o ± 223 p < o,o2	53%	2853 ± 453	81%
Fraktion 7 2,o M NaCl in o,o5 M HCl	733o ± 67o	1oo%	13o81 ± 67 p < o,oo1	178%	4987 ± 292 p < o,o1	68%

$^{+}$bezogen auf Uronsäure

DER EINFLUSS VON 4 SPEZIFISCHEN INHIBITOREN AUF DIE

Na-Selenat $5 \cdot 10^{-6}$M (n=3-4) dpm ^{3}H/µMol HexN		Phenylbutazon $5 \cdot 10^{-4}$M (n=3-4) dpm ^{3}H/µMol HexN		Fraktion
8139 ± 434	104%	4935 ± 361 p < 0,001	63%	Papaindigest
3005 ± 457 p < 0,02	76%	2273 ± 267 p < 0,001	58%	CPC-gereinigte Ausgangsfraktion
2651 ± 1535	114%	3238 ± 1018	139%	Fraktion 1 0,05 M HCl
515 ± 311+	26%	15940 ± 7688+	820%	Fraktion 2 0,1 M NaCl in 0,05 M HCl
2598 ± 2320+	79%	4256 ± 1236+	130%	Fraktion 3 0,25 M NaCl in 0,05 M HCl
4841 ± 938	76%	4136 ± 144	65%	Fraktion 4 0,5 M NaCl in 0,05 M HCl
2533 ± 379 p < 0,005	68%	2086 ± 129 p < 0,005	56%	Fraktion 5 0,75 M NaCl in 0,05 M HCl
2658 ± 365 p < 0,05	75%	2003 ± 405 p < 0,005	57%	Fraktion 6 1,0 M NaCl in 0,05 M HCl
5439 ± 596 p < 0,005	74%	5774 ± 1120 p < 0,05	79%	Fraktion 7 2,0 M NaCl in 0,05 M HCl

Mittelwert mit Standardabweichung
Prüfung auf Signifikanz mittels t-Test nach Student

TABELLE: 4 ^{14}C-Serineinbau

2o Min. Vorinkubation, 9o Min. Inkubation mit ^{14}C-Serin

Fraktion	Kontrollen (n=2-4) dpm ^{14}C-Serin/µMol	US	Puromycin $5.1o^{-5}$M (n=2) dpm ^{14}C-Serin/µMol	US	6-Diazo-5-oxonorleuci $2.1o^{-4}$M (n=2) dpm ^{14}C-Serin/µMol	US
Papaindigest	148o ± 42	1oo%	412 ± 1 p < o,oo1	28%	1216 ± 2o p < o,oo5	82%
CPC-gereinigte Ausgangsfraktion	452 ± 1	1oo%	12 ± 1 p < o,oo1	3%	328 ± 3o p < o,o5	73%
Fraktion 1 o,o5 M HCl	5o ± 31	1oo%	11	22%	27 ± 16	54%
Fraktion 2 o,1 M NaCl in o,o5 M HCl	69 ± 54	1oo%	1o7 ± 18	155%	33o n=1	478%
Fraktion 3 o,25 M NaCl in o,o5 M HCl	465 ± 27o	1oo%	143	31%	9o9 ± 736	195%
Fraktion 4 o,5 M NaCl in o,o5 M HCl	166o ± 44	1oo%	26 ± 2 p < o,oo1	2%	1434 ± 39o	86%
Fraktion 5 o,75 M NaCl in o,o5 M HCl	527 ± 34	1oo%	12 ± 2 p < o,oo5	2%	323 ± 47 p < o,o5	61%
Fraktion 6 1,o M NaCl in o,o5 M HCl	352 ± 6o	1oo%	6	2%	176 ± 3o	5o%
Fraktion 7 2,o M NaCl in o,o5 M HCl	584 ± 1o5	1oo%	12 ± 11 p < o,o2	2%	267 ± 25	46%

DER EINFLUSS VON 4 SPEZIFISCHEN INHIBITOREN AUF DIE

Na-Selenat $5 \cdot 10^{-6}$M (n=2) dpm^{14} C-Serin/µMol	US	Phenylbutazon $5 \cdot 10^{-4}$M (n=2) dpm^{14} C-Serin/µMol	US	Fraktion
1229 ± 158 $p < 0,05$	83%	1024 ± 9 $p < 0,001$	69%	Papaindigest
341 ± 48	75%	225 ± 9 $p < 0,001$	50%	CPC-gereinigte Ausgangsfraktion
63 ± 29	126%	28 ± 7	56%	Fraktion 1 0,05 M HCl
66 ± 48	96%	211 ± 121	306%	Fraktion 2 0,1 M NaCl in 0,05 M HCl
364 ± 3	78%	366 ± 139	79%	Fraktion 3 0,25 M NaCl in 0,05 M HCl
1637 ± 386	99%	958 ± 9 $p < 0,005$	58%	Fraktion 4 0,5 M NaCl in 0,05 M HCl
436 ± 71	83%	219 ± 1 $p < 0,01$	42%	Fraktion 5 0,75 M NaCl in 0,05 M HCl
290 ± 33	82%	134 ± 7 $p < 0,05$	38%	Fraktion 6 1,0 M NaCl in 0,05 M HCl
444 ± 16	76%	272 ± 9	47%	Fraktion 7 2,0 M NaCl in 0,05 M HCl

Mittelwert mit Standardabweichung

Prüfung auf Signifikanz mittels t-Test nach Student

jeweiligen Inhibitor 8o min inkubiert, sodann der Inhibitor ausgewaschen und die Schnitte mit radioaktivem Precursor (ohne Inhibitor) 6o min inkubiert (s. 2.2.3. C). Nach Entfernung von Selenat wurden besonders die kürzeren, untersulfatierten Seitenketten (Fraktionen 2,3,4) höher spezifisch ^{35}S-markiert als entsprechende Kontrollen, während nach Phenylbutazon dieser Effekt nicht beobachtet wurde (Fig. 3). Noch stärker wurden diese kürzeren Seitenketten nach Entfernung von D.O.N. mit [^{3}H]Glucosamin-markiert (Fig. 4). Nach Auswaschung von Puromycin wurde ein qualitativ ähnliches Markierungsmuster der Peptidreste der ChS-Seitenkettenfraktionen mit [^{14}C]Serin gefunden wie bei Kontrollen, jedoch quantitativ deutlich vermindert (Fig. 5).

3.6. Der Effekt von spezifischen Inhibitoren auf die anaerobe Glycolyse von Knorpelschnitten in vitro

Die anaerobe Glycolyse der Knorpelschnitte wurde mittels der CO_2-Produktion gemessen (vgl. 2.2.4.). Sie war unter D.O.N. und Selenat in der ersten und zweiten Inkubationsstunde nicht vermindert im Vergleich zu Kontrollen (Tab. 5), ebenso unter Phenylbutazon, dort jedoch während der zweiten Stunde leicht erniedrigt und stärker noch nach seiner Entfernung aus dem Medium. Puromycin verminderte geringgradig, aber signifikant die Glycolyserate, auch nach seiner Entfernung aus dem Medium (Tab. 5).

4. Diskussion

Die gereinigte Chondroitinsulfatpeptidfraktion enthält zu mehr als 98% Chondroitinsulfat-(ChS-)Seitenketten und weniger als 2% Keratansulfat (vgl. 7,13) und eignet sich damit gut zum Studium der Biosynthese von Chondroitinsulfat im Kälberrippenknorpel. Die in-vitro-Markierung dieser ChS-Fraktion mit den radioaktiven Vorstufen $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin über

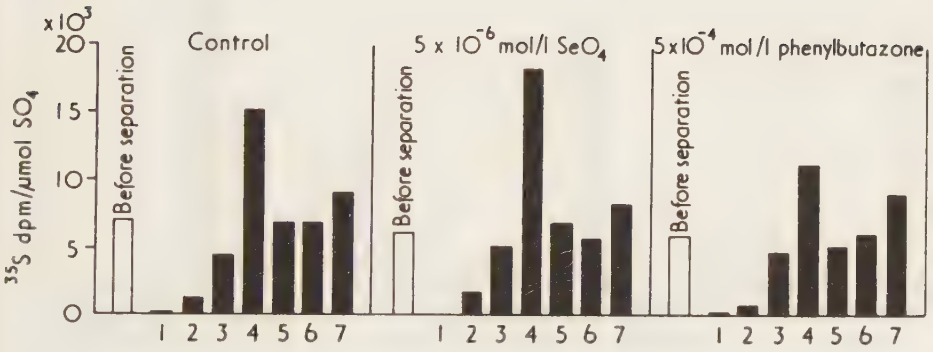

Fig. 3 Recovery-Effekt der ChS-Seitenkettenmarkierung nach Vorinkubation mit SeO_4^{2-} und Phenylbutazon und Inkubation mit $^{35}SO_4^{2-}$. Methodik s. insbesondere 2.2.3. C.

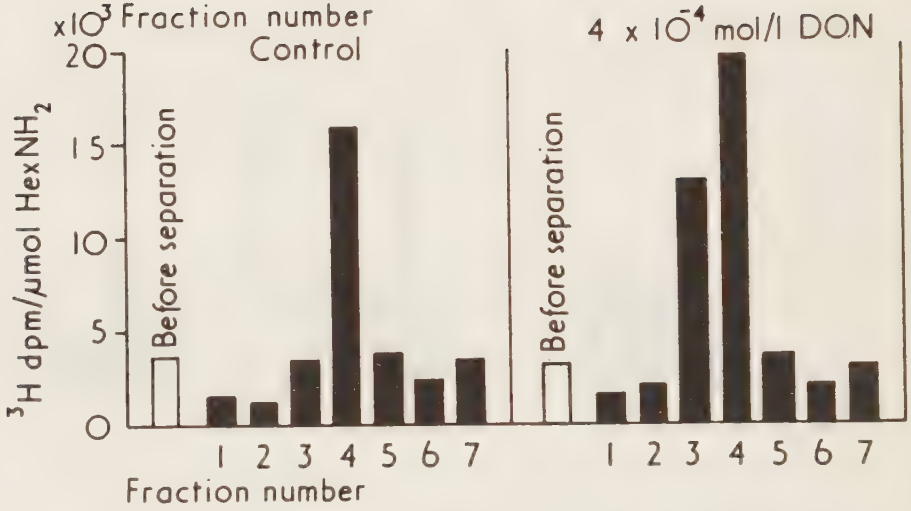

Fig. 4 Recovery-Effekt der ChS-Seitenkettenmarkierung nach Vorinkubation mit 6-Diazo-5-oxo-Norleucin und Inkubation mit [^{3}H]Glucosamin.
Methodik s. insbesondere 2.2.3. C.

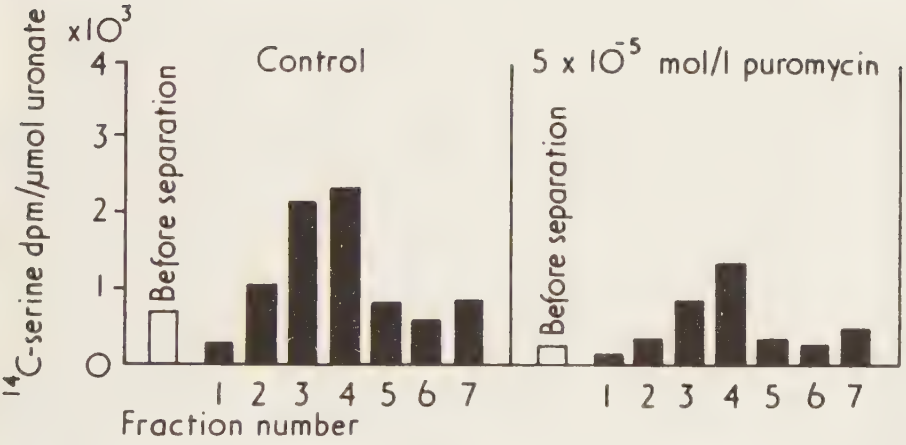

Fig. 5 Recovery-Effekt der ChS-Seitenkettenmarkierung nach Vorinkubation mit Puromycin und Inkubation mit [^{14}C]Serin.
Methodik s. insbesondere 2.2.3. C.

ANAEROBE GLYKOLYSERATE UNTER DEM EINFLUSS VON 4 SPEZIFISCHEN INHIBITOREN DER BIOSYNTHESE VON ChS-SEITENKETTEN IM KÄLBERRIPPENKNORPEL

	μMol CO_2 . 1g FG^{-1}. 60 min^{-1}	μMol CO_2 . 1g FG^{-1}. 60 min^{-1}	μMol CO_2 .1g FG^{-1}. 60 min^{-1}
Inkubationszeit	erste Stunde	zweite Stunde ohne Waschen	zweite Stunde nach Waschen
Kontrollen	2,555 ± 0,199 n=9 100 % (100 %)	2,542 ± 0,214 n=10 100 % (99 %)	2,524 100 % (99 %)
Puromycin 5 . 10^{-5} M	1,968 ± 0,226 n=4 77 % (100 %) p<0,001	2,048 ± 0,296 n=2 81 % (104 %) p<0,02	1,687 67 % (86 %)
DON 2 . 10^{-4} M	2,709 ± 0,317 n=4 106 % (100 %)	2,669 ± 0,354 n=2 105 % (99 %)	4,277 169 % (158 %)
Na-Selenat 5 . 10^{-6} M	2,520 ± 0,401 n=17 99 % (100 %)	2,524 ± 0,607 n=17 99 % (100 %)	2,079 82 % (83 %)
Phenylbutazon 5 . 10^{-4} M	2,737 ± 0,140 n=6 107 % (100 %)	2,131 ± 0,153 n=4 84 % (78 %) p<0,005 (p<0,001)	1,860 74 % (68 %)

Tabelle 5 Mittelwert mit Standardabweichung, Prüfung auf Signifikanz mittels t-Test nach Student
Werte in Klammern: Vergleich gegenüber der ersten Stunde

verschieden lange Zeiten zeigt eine lineare Zunahme der spezifischen Radioaktivität der Sulfatester und der Polysaccharidbausteine erst nach 35-45 min Inkubation, wobei die Markierung mit [^{3}H]Glucosamin deutlich niedriger liegt als diejenige mit $^{35}SO_4^{2-}$, was auf eine verspätete und geringere Markierung der UDP-N-Acetylhexosaminfraktion in Knorpelzellen zurückgeführt werden kann (vgl.11). Die Energieproduktion der Knorpelzellen in diesem semi-in-vitro-System mittels anaerober Glycolyse scheint ausreichend zu sein, wie die lineare Zunahme der CO_2-Bildung bis zu 9o min Inkubation anzeigt.

Mittels Chromatographie der ChS-Peptid-Fraktion auf ECTEOLA-Zellulose wird ein ganzes Spektrum verschieden langer und unterschiedlich sulfatierter Seitenketten isoliert mit einem geringen Anteil (< 1% der gesamten Hexuronsäure) von untersulfatierten, kurzkettigen Ch-S-Ketten (M.G.< 5ooo, ECTEOLA-Fraktionen 2,3) und größeren Anteilen von längeren, stärker sulfatierten Seitenketten. Da die spezifische Radioaktivität der Sulfatester und der Polysaccharidkette dieser kurzen, untersulfatierten ChS-Seitenketten nach 1o bzw. 3o min Inkubation mit den radioaktiven Vorstufen $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin am höchsten ist und nach längerer Inkubation etwas längere und weniger untersulfatierte ChS-Seitenketten die höchsten spezifischen Radioaktivitäten aufweisen (ECTEOLA-Fraktion 4), stellen die kurzen, untersulfatierten ChS-Ketten sehr wahrscheinlich die Vorstufen der längeren, weniger untersulfatierten ChS-Ketten dar, die zu langen, gleichmäßig sulfatierten Ketten im System heranwachsen (ECTEOLA-Fraktionen 5,6) mit geringeren spezifischen Radioaktivitäten, da von diesen ein großer inaktiver Pool in den Kälberrippenknorpelschnitten vorliegt. Einen besonderen Synthesemechanismus scheinen die leicht übersulfatierten, längeren ChS-Ketten der ECTEOLA-Fraktion 7 zu haben, die kleine Mengen von Dermatansulfat enthalten (12,14) und die hohe Sulfatestermarkierungsraten nach 1o, 3o und 6o min Inkubation aufweisen, nach 9o min dagegen die höchsten spezifischen Radioaktivitäten aller Ketten für Sulfatester und der Polysaccharidkette besitzen.

Diese Ergebnisse indizieren einen Biosynthesemechanismus von ChS-Seitenketten, bei dem kurze, untersulfatierte Ketten zuerst am Peptidcore rasch gebildet werden und zu längeren, stärker sulfatierten Ketten mittels Kettenverlängerung und nachfolgender Sulfatierung heranwachsen. Eine Ausnahme scheinen die leicht übersulfatierten ChS-Ketten zu machen, bei denen offenbar fertige ChS-Ketten sulfatiert werden können.

Diese These soll weiterhin untermauert werden durch Verwendung von Stoffwelchselinhibitoren, die jeweils einen bestimmten Schritt in der ChS-Biosynthese hemmen (vgl.6).
Puromycin hemmt spezifisch die Proteinbiosynthese auf ribosomaler Ebene (5,18), wo es als Transfer-RNS in die wachsende Polypeptidkette des Proteincores eingebaut wird und deren Vervollständigung verhindert. Meine Ergebnisse untermauern diesen Befund, indem sie einen kompletten Stop des [^{14}C]Serineinbaues in die ChS-Peptide der längeren Ketten zeigen, nur die kurzen, wachsenden ChS-Peptide sind markiert. Da unter diesen Bedingungen der Einbau von $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin nicht vollständig unterbrochen ist, sondern vermindert in kürzere und längere Ketten weiterläuft, dürften in meinem System unvollständige ChS-Ketten vorhanden sein, die noch nach vollständigem Block der Proteincore-Biosynthese bis zu einem gewissen Grade verlängert und sulfatiert werden. Ähnliche Befunde sind bereits beschrieben worden (11,16). Eine Ausnahme macht die leicht übersulfatierte ChS-Kettenfraktion 7, deren Markierung unter Puromycin nicht gehemmt, sondern gesteigert ist. Dieser Befund ließe sich durch einen verstärkten Einbau aus radioaktiv markierten aktivierten Vorstufen wie UDP-N-Acetyl-Hexosamine und ^{35}S-PAPS erklären, die unter Puromycin höher markiert sind (11,16). Der Puromycin-Effekt ist jedoch nicht voll reversibel, da nach Auswaschung (6-maliger Mediumwechsel) ein geringerer Einbau von [^{14}C]Serin in ChS-Peptide erfolgt im Vergleich zu Kontrollen, was möglicherweise auf eine Hemmung der anaeroben Glycolyse durch Puromycin (der einzig möglichen Energiebildung im System) zurückgeführt werden kann.

6-Diazo-5-oxo-Norleucin (D.O.N.) hemmt die Hexosaminbiosynthese durch Beeinflussung der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase (4). In meinem System war jedoch von allen angebotenen radioaktiven Vorstufen der Einbau von [^{14}C]Serin in die Gesamt-ChS-Peptidfraktion am stärksten vermindert, was einen hemmenden Einfluß von D.O.N. auf die Biosynthese des Coreproteins anzeigt und sich in einer verminderten Markierung der Peptidreste von längeren ChS-Ketten äußerte, gefolgt von einem verminderten Einbau von [^{3}H]Glucosamin und $^{35}SO_4^{2-}$. Diese Hemmung dürfte während der 9o min Inkubation aufgehoben worden sein, da kurze ChS-Ketten einen vermehrten Einbau aller drei Precursor aufweisen, der ähnlich verlief wie der gesteigerte Einbau von [^{3}H]Glucosamin in kürzere ChS-Ketten nach Auswaschen von D.O.N..D.O.N. zeigte keinerlei Wirkung auf die anaerobe Glycolyserate.

Selenat hemmt die Sulfatierung bei der ChS-Proteinbiosynthese und nicht die anaerobe Glycolyse (11). Demzufolge war der Einbau von $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Glucosamin (weniger von [^{14}C]Serin) in alle Seitenketten etwa gleich stark gehemmt, was anzeigt, daß eine Rückkoppelung zwischen Sulfatierung und Kettenverlängerung einerseits und ChS-Kettenbildung und Proteincore-Biosynthese andererseits besteht (vgl. 9,11). Diese Hemmung ist reversibel: Nach Auswaschen von Selenat wurde ein verstärkter Einbau von $^{35}SO_4^{2-}$ beobachtet.

Phenylbutazon hemmt offenbar Hexosaminbildung (3) und Proteincore-Biosynthese (1o). Bei meinen Versuchen war der Einbau von [^{14}C]Serin am stärksten in die Peptidreste längerer Ketten vermindert, in solche kürzerer Ketten weniger oder gar vermehrt. Hieraus ist zu schließen, daß diese Hemmwirkung nicht über die ganze Inkubationszeit von 9o min besteht und offenbar erst später eintritt, wie aus der Verminderung der anaeroben Glycolyserate in der zweiten Inkubationsstunde geschlossen werden könnte. Auch ist diese Hemmwirkung nicht voll reversibel.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß meine Untersuchungen einen Mechanismus der Chondroitinsulfatproteinbiosynthese in-

dizieren, bei dem zuerst kurze, untersulfatierte ChS-Seitenketten an ein vorher gebildetes Proteincore aufgebaut werden, die durch Kettenverlängerung mit gekoppelter Sulfatierung zu längeren, stärker sulfatierten Seitenketten heranwachsen. Bei der Biosynthese bestehen Rückkopplungsmechanismen zwischen Sulfatierung und Kettenverlängerung einerseits und Sulfopolysaccharidbildung und Proteincore-Synthese andererseits, wie es mittels spezifischer Inhibitoren gezeigt werden konnte.

5. Zusammenfassung

In einem semi-in-vitro-System aus Kälberrippenknorpel wird die Biosynthese von Chondroitinsulfat-(ChS-)Seitenketten mittels Einbaus von radioaktiven Vorstufen ($^{35}SO_4^{2-}$, [^{3}H]Glucosamin, [^{14}C]Serin) untersucht. Zeitabhängigkeitsuntersuchungen (1o, 3o, 6o, 9o min) zeigen einen linearen Anstieg der eingebauten Radioaktivität in die Gesamt-ChS-Peptidfraktion erst in der 35. bis 45. min, wobei der $^{35}SO_4^{2-}$-Einbau 2-4 mal höher war als derjenige von [^{3}H]Glucosamin, obwohl während dieser Zeit die CO_2-Produktion (ein Maß der anaeroben Glycolyserate) linear anstieg.

Mittels Chromatographie auf ECTEOLA-Zellulose wurde die ChS-Peptidfraktion in 7 Seitenkettenunterfraktionen mit zunehmender Kettenlänge und ansteigendem Sulfatisierungsgrad aufgetrennt. Kurze untersulfatierte Ketten (M.G.< 5ooo) zeigten nach kurzer Inkubation (1o-3o min) eine deutlich höhere spezifische Radioaktivität der Sulfatester und der Polysaccharidkette als längere, stärker sulfatierte Ketten. Nach längerer Inkubation wiesen längere, stärker sulfatierte Ketten die höchste spezifische Radioaktivität auf. Diese Befunde machen einen Biosynthesemechanismus sehr wahrscheinlich, bei dem kurze, untersulfatierte ChS-Ketten an einem Proteincore zuerst gebildet werden und dann durch Kettenverlängerung mit nachfolgender Sulfatierung zu längeren, stärker sulfatierten ChS-Ketten heranwachsen. Eine Ausnahme scheinen längere, leicht übersulfatierte

Ch-S-Ketten zu machen, die nach 9o min Inkubation am höchsten markiert waren.

Durch Hemmung der Proteincore-Biosynthese mittels Puromycin, der Aminozuckerbildung mittels 6-Diazo-5-oxo-Norleucin und der Sulfatierung mittels Selenat lassen sich Rückkopplungsmechanismen zwischen Sulfatierung und Kettenverlängerung einerseits und Bildung von Ch-S-Ketten und Proteincore-Biosynthese andererseits aufzeigen. Phenylbutazon scheint sowohl Proteincoresynthese als auch die Aminozuckerbildung zu hemmen. Diese Effekte sind nur teilweise reversibel.

Literatur

1) C.A. ANTONOPOULOS, S. GARDELL, J.A. SZIRMAI & E.R. de TYSSONSK: Determination for glycosaminglycans (mucopolysaccharides) from tissue on the microgram scale. Biochim.Biophys.Acta 83 (1964) 1-19.

2) T. BITTER & H.M. MUIR: A modified uronic acid carbazole reaction. Analyt.Biochem. 4 (1962) 33o-334.

3) A.J. BOLLET: Arthr. and Rheum. 4 (1961) ref. in 7)

4) S. GOSH, H.J. BLUMENTHAL, E. DAVIDSON & S. ROSEMAN: Glucosamine metabolism. Enzymatic synthesis of glucosamine-6-phosphate. J.Biol.Chem. 235 (196o) 1265-1273.

5) B.L.M. HOGAN: The effect of inhibitors of protein synthesis in ascites cells. Biochim.biophys.Acta 182 (1969) 264-266.

6) T.O. KLEINE: Struktur, Biosynthese und Heterogenität der Chondroitinsulfatproteine. Die Naturwissenschaften 59 (1972) 64-71.

7) T.O. KLEINE: Hyaluronate-proteoglycan complex: evidence for separate biosynthesis mechanisms of the macromolecules. Connective Tissue Res. 5 (1978) 195-199.

8) T.O. KLEINE & H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine I. Charakterisierung der Protein-Polysaccharide aus Kälberrippenknorpel und ihre In-vitro-Markierung mit $^{35}SO_4^{2-}$. Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 349 (1968) 1o27-1o36.

9) T.O. KLEINE & H. HILZ: Metabolically different proteoglycans in calf rib cartilage. In: Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. (E.A. BALAZS ed.) Academic Press London Vol.II, 197o, pp. 9o7-921.

1o) T.O. KLEINE, W. HILD & F. DAPPER: Effect of anti-inflammatory drugs on the biosynthesis of Ch-4-S peptides in aging bovine cartilage. Scand.J.Clin.Lab.Invest. 29 123 (1972) 21.

11) T.O. KLEINE, H.J. KIRSIG & H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine II. Über die Koordinierung von Protein-, Polysaccharid- und Sulfatester-Synthese im Rippenknorpel von Kälbern. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 349 (1968) 1o37-1o48.

12) T.O. KLEINE & R. STEPHAN: Overlabelling of chondroitin sulphate (ChS) chains after application of specific inhibitors of their biosynthesis. Ann.rheum.Dis. 34 (1975) Suppl. pp. 61-62.

13) T.O. KLEINE & R. STEPHAN: Biosynthesis of chondroitin sulfate side chains and hyaluronate. Time-course studies with cartilage slices of calf ribs under different conditions. Biochim.Biophys.Acta 451 (1976) 444-456.

14) T.O. KLEINE & R. STEPHAN: Chemically and metabolically heterogeneous dermatan-4-sulfate chondroitin-4-, 6-sulfate hybrid side chains in hyaline cartilage of calf ribs. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 358 (1977) 123o-1231.

15) H. MUIR: Structure and function of proteoglycans of cartilage and cell-matrix interactions. In: Cell and Tissue Interactions. (J.W. LASH, M.M. BURGER eds.) Raven Press New York 1977, pp. 87-99.

16) A. TELSER, H.C. ROBINSON & A. DORFMAN: The biosynthesis of chondroitin-sulfate protein complex. Proc.Natl. Acad.Sci. U.S. 54 (1965) 912-919.

17) W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS & J.F. STAUFFER: Manometric Techniques. Burgess Publishing Company, Minneapolis 1964.

18) A.R. Williamson & R. SCHWEET: Role of the genetic message in polyribosome function. J.Mol.Biol. 11 (1965) 358-372.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.Jacob, ehemaliger Direktor der Universitäts-Nervenklinik habe ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zu danken.
Ganz besonders zu danken habe ich Herrn Prof. Dr. T.O.Kleine für die Bereitstellung eines Themas, für Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
Den Damen und Herren des Klinisch-chemischen Labors möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

Geboren am 1o. 1o. 46 in Leipzig als Sohn der kaufmännischen Angestellten Kurt und Marianne Stephan. Tod des Vaters Juni 47.
Einschulung 1. 9. 53
19. 5. 61 Übersiedlung in die BRD.
Abschluß der Volksschulpflicht Ostern 62 in der ev. Volksschule Rheydt-Geistenbeck.
Besuch des ev. Aufbaugymnasiums in Herchen/Sieg von Ostern 1962 bis 11. 7. 1967.
Beginn des Studiums der Humanmedizin in Marburg zum Wintersemester 67/68.
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 3o. 9. 68.
Ärztliche Vorprüfung am 2o. 3. 7o.
Ärztliche Prüfung (Staatsexamen) am 16. 8. 73.
Während des klinischen Semesters Beginn mit der Doktorarbeit im klinisch-chemischen Labor der Nervenklinik bei Professor Kleine.
Approbation am 1. 1o. 74.
Vom 1. 1. 75 bis 31. 12. 75 Assistent bei Professor Wepler am Pathologischen Institut des Stadtkrankenhauses Kassel.
Vom 1. 1. 76 bis 3o. 9. 76 Assistenzarzt in der Anästhesieabteilung des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss.

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Aust, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Daume, Dimroth, Dölle, Eißner, Englhardt, Exner, Friederich, Ganz, Graul, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Heinecker, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hort, Jacob, Jahnke, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Kleine, Koecke, Koransky, Linneweh, Lütcke, Mahr, Mann, Martini, Nöth, Nultsch, Petry, Pfau, Pots, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Spiegelberg, Straub, Streicher, Stuke, Uhlarik, Walcher, Wehrmeyer, Wepler.